

·专题·

miRNA205 在神经胶质瘤细胞放疗敏感性中的作用

尹江,张志杰,贺智敏

(广州医科大学附属肿瘤医院肿瘤研究所,广东 广州 510095)

摘要:目的 观察 miRNA205 对神经胶质瘤放疗敏感性的影响,并探讨其增敏机制。方法 采用 miRNA mimic miRNA205 及阴性对照 miRNA mimic NC 分别转染胶质瘤细胞 U251, RT-qPCR 检测 miRNA205 的表达量,平板克隆检测细胞放射治疗后的克隆形成能力及 Western Blot 检测 DNA 损伤修复能力。结果 miRNA205mimic 能够上调细胞中 miRNA205 的过表达(11.3±1.55)倍,经 6 Gy 放射治疗后对照组 U251/NC 形成的克隆数为(37.33±5.86)个,过表达 miRNA205 的实验组 U251/miR205 形成的克隆数为(15±7.94)个;放疗 24 小时后 U251 细胞中的 DNA 损伤标志物恢复到正常水平,而 U251/miRNA205 在放疗后 24 h 仍有较高表达。结论 miRNA205 能够抑制 U251 细胞的 DNA 损伤修复能力,抑制细胞放疗后的克隆形成能力,提高放疗敏感性。

关键词:胶质瘤;miRNA205;放疗敏感性;DNA 损伤修复

中图分类号:R739

文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.1006-1959.2021.13.001

文章编号:1006-1959(2021)13-0001-03

The Role of miRNA205 in the Sensitivity of Glioma Cells to Radiotherapy

YIN Jiang,ZHANG Zhi-jie,HE Zhi-min

(Institute of Oncology,Affiliated Tumor Hospital of Guangzhou Medical University,Guangzhou 510095,Guangdong,China)

Abstract:Objective To observe the effect of miRNA205 on the sensitivity of glioma to radiotherapy, and to explore its sensitization mechanism. Methods The glioma cells U251 were transfected with miRNA mimic miRNA205 and the negative control miRNA mimic NC. RT-qPCR was used to detect the expression of miRNA205. The plate clone was used to detect the clone formation ability of the cells after radiotherapy and Western Blot to detect the DNA damage repair ability. Results miRNA205mimic can up-regulate the overexpression of miRNA205 in cells (11.3±1.55) times, after 6 Gy radiotherapy, the number of clones formed by U251/NC in the control group was (37.33±5.86), and the number of clones formed by U251/miR205 in the experimental group overexpressing miRNA205 was (15±7.94); The DNA damage markers in U251 cells returned to normal levels 24 h after radiotherapy, while U251/miRNA205 still had a high expression 24 h after radiotherapy. Conclusion miRNA205 can inhibit the DNA damage repair ability of U251 cells, inhibit the clone formation ability of cells after radiotherapy, and improve the sensitivity of radiotherapy.

Key words: Glioma;miRNA205;Radiotherapy sensitivity;DNA damage repair

微小 RNA(miRNA 或者 miR)是指一类由 18~25 个核苷酸组成小分子非编码 RNA^[1]。miRNA 通过与目的基因信使 RNA (mRNA)3' UTR 完全或不完全配对,导致靶基因 mRNA 降解或抑制靶基因 mRNA 的翻译,最终抑制靶基因的蛋白表达^[2]。人类编码基因有超过 60% 的基因受到 miRNA 的调控。在肿瘤细胞中,miRNA 常呈现出表达异常的现象^[3]。在结肠癌患者组织中,miR506 在癌组织中的表达水平较癌旁组织中的表达水平要高^[4]。HBV 病毒蛋白可以抑制 miR148a 的表达,可以导致肝细胞癌的发生。神经胶质瘤是成年人中最常见的原发性神经系统恶性肿瘤,其发病率随着年龄增长而增加。全球每年约 30 万人被诊断患有神经胶质瘤。胶质瘤的临床治疗以手术治疗为主,在安全范围内进行最大程度的切除肿瘤组织,辅以放疗和化疗。放射治疗在胶质瘤的治疗中发挥重要作用,能够明显延长胶质瘤患者的生存期。越来越多的研究表明 miRNA 在胶质瘤的发生发展中发挥重要作用^[5]。而 miRNA205

在胶质瘤中的作用鲜有报道,且其是否参与胶质瘤的放疗抵抗有待揭晓,本研究试图阐述 miRNA205 与胶质瘤放疗敏感性的关系。

1 材料与与方法

1.1 材料 胶质瘤细胞系 U251 购自美国样本典藏中心(ATCC)由本实验室保存;miRNA205 过表达及对对照模拟物(miRNAmimic)、miRNA 逆转录试剂盒及定量检测试剂盒购自广州复能基因有限公司;rH2AX、-actin 抗体购自 CST 公司(Cell Signalling Technology)。

1.2 细胞培养及转染 胶质瘤细胞系 U251 的培养采用含有 10%胎牛血清的 DMEM 完全培养基,培养条件为 37 ℃,5%CO₂ 浓度,饱和湿度。质粒的转染:将细胞种植在 6 孔板中,每个孔种植 10⁵ 个细胞,待细胞长至 70%汇合度时将培养基更换为无血清的 DMEM 培养基,采用脂质体试剂 Lipofectamine2000,按照操作说明进行转染实验,转染 miRNA205 mimics 的细胞作为 U251/miRNA205;转染对照物 miRNA control 的细胞为 U251/NC。6 h 后再更换为含有血清的完全培养基进行培养,48 h 后进行后续实验。

1.3 实时荧光定量 PCR 检测 实时荧光定量 PCR 检测又称 RT-qPCR,将 U251/NC 及 U251/miR205 细

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:81902846)

作者简介:尹江(1986.8-),男,湖南邵阳人,硕士,实验师,主要从事肿瘤治疗耐受机制研究

通讯作者:张志杰(1980.7-),男,山西临汾人,博士,副研究员,主要从事肿瘤治疗耐受机制研究

胞采用 Trizol 法提取细胞总 RNA, 将 2 μg 的总 RNA 采用复能生物的 All-in-One™ miRNA First-Strand cDNA Synthesis Kit 2.0 试剂盒逆转录 miRNA, 采用 All-in-One™ miRNA qPCR Kit 试剂盒, 以 U6 为内参, 进行 miRNA205 表达水平的检测。

1.4 细胞克隆形成能力检测 将实验组细胞 U251/miRNA205 和对照组细胞 U251/NC 分别种植 6 个复孔, 待细胞贴壁后未经放射治疗组为 0Gy 组, 或采用 X 射线进行放射治疗的 6Gy 组。转移至正常条件下进行培养, 待细胞克隆生长至约含有 50 个细胞的集落, 进行结晶紫染色, 计数各条件下细胞克隆数量并进行分析。

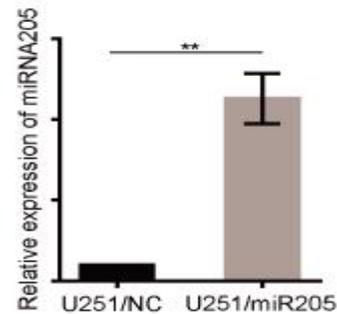
1.5 免疫印迹实验(Western Blot)检测细胞中的蛋白表达 细胞总蛋白的提取采用碧云天公司生产的 RIPA 强裂解液。经放疗后的 U251/miRNA205 和 U251/NC 细胞, 每隔 4 h 收集并裂解, 离心收集上清, 经 BCA 法测定蛋白浓度, 煮沸变性后进行 Western Blot 分析, 每个时间点各样品的上样量为 30 μg 总蛋白, 电泳后转印至 PVDF 膜, 5%脱脂奶粉 TBST 溶液进行封闭, 抗体以说明书比例采用一抗稀释液稀释, 4 °C 孵育过夜, TBST 洗涤 3 次, 5 min/次, 带辣根过氧化物酶标记的二抗在室温条件下孵育 2 h, ECL 发光, 采用 Tanon 化学发光仪进行检测。

1.6 统计学分析 细胞克隆统计结果采用 SPSS 15.0 进行统计分析, 分析方法是 t 检验, P<0.05 代表差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 RT-qPCR 检测 miRNA205 的表达水平 采用 RT-qPCR 检测实验组 U251/miRNA205 及对照组细胞 U251/NC 细胞中 miRNA205 的表达水平, 其中 U251/miRNA205 组^ΔCT 值为(12.16±0.31), U251/NC

组^ΔCT 值为(15.65±0.39), ^{ΔΔ}CT 为(3.49±0.19)。经计算 U251/miRNA205 中 miRNA205 的表达较 U251/NC 细胞中 miRNA205 的表达上调了(11.3±1.55)倍, 且差异有统计学意义(P=0.0003), 见图 1。

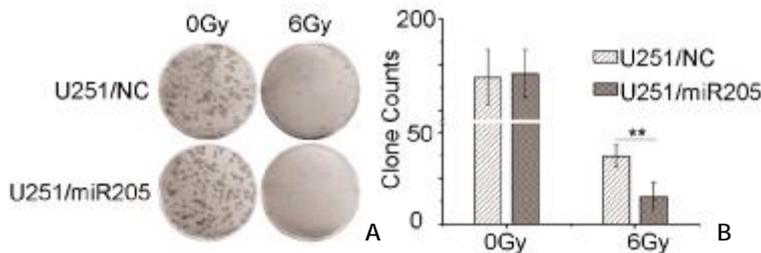


注: **P=0.0003

图 1 RT-qPCR 检测细胞中 miRNA205 的表达水平

2.2 miRNA205 抑制胶质瘤细胞放疗后的克隆形成 对 0Gy 组细胞形成的克隆数量进行计数, U251/NC 形成的克隆数为(134.67±7.77), U251/miRNA205 形成的克隆数为(129.67±12.58), 0Gy 组的 U251/miR205 细胞的克隆数与 U251/NC 组无明显差异, P=0.59; 而 6Gy 组的细胞进行克隆计数显示, U251/miR205 细胞形成的克隆数为(15±7.94)个, 明显少于 U251/NC 细胞的克隆个数(37.33±5.86), 且差异有统计学意义(P=0.0172), 见图 2。

2.3 miR205 抑制胶质瘤细胞 DNA 损伤修复能力 6 Gy 的放射剂量均能对细胞产生明显的 DNA 损伤作用, 且对 U251/miRNA205 及 U251/NC 的损伤程度相当。24 h 时 U251/NC 组细胞的 DNA 损伤水平明显下降, 恢复到放疗前水平, 而 U251/miRNA205 细胞 DNA 损伤修复能力变弱, 24 h 时 DNA 损伤标志物的表达水平仍处于, 见图 3。



注:A:细胞克隆形成能力检测;B:克隆数统计分析, **P=0.0172

图 2 miRNA205 抑制 U251 细胞放疗后克隆形成能力

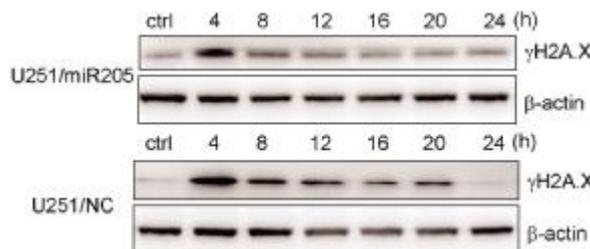


图 3 Western Blot 检测 rH2A.x 的表达水平

3 讨论

miRNA 在细胞的增殖、分化、凋亡等过程均起到一定作用^[1]。miRNA 主要通过与其靶基因 mRNA 3' UTR 相结合,抑制靶基因的翻译或诱导靶基因 mRNA 的降解,从而降低靶基因的表达水平。有研究表明 miRNA205 可以通过抑制 ZEB1 等基因的表达,抑制乳腺癌细胞干细胞特性的维持^[6]。miRNA205 还能通过抑制 ErbB 的表达从而导致靶向药物的治疗耐受。miRNA205 被认为可以通过影响肿瘤细胞的增殖、分化、凋亡、侵袭等生物学行为,参与多种肿瘤的发生发展^[7-9]。Chen W 等^[10]发现在胶质母细胞瘤中 miRNA205 通过抑制 ZEB1 发挥作用,抑制胶质母细胞瘤的生长和转移。在胶质瘤细胞中抑制 MiR34a 的表达可以增强其体内成瘤能力,上调 miR497 的表达可以强胶质瘤细胞 U87 对化疗药物替莫唑胺的敏感性^[11]。因此 miRNA 可以通过影响多种不同的信号通路发挥癌基因或抑癌基因的作用,本研究的实验结果显示,过表达 miRNA205 对胶质瘤细胞系 U251 的克隆形成能力无明显影响。

放射治疗是胶质瘤等肿瘤重要且有效的治疗手段,也是高级别胶质瘤必要的治疗方式之一,能够明显延长胶质瘤患者的生存期^[12]。放射治疗的作用机理主要是通过对肿瘤细胞 DNA 造成损伤,当肿瘤细胞 DNA 发生双链断裂时,无法修复的肿瘤细胞随即发生凋亡或增殖停滞,从而实现抑制肿瘤的目的。当 DNA 发生双链断裂时 H2A.x 被磷酸化成 rH2A.x,因此 rH2A.x 的表达水平可以作为 DNA 损伤水平的标志物。通过检测细胞中 rH2A.x 的表达水平的变化,可以评价肿瘤细胞对放射治疗的敏感性及 DNA 损伤修复能力^[13]。对放射治疗产生抵抗是导致放疗失败的主要原因,然而产生放疗抵抗的机制尚不明确,也未有良好的治疗方案增强胶质瘤细胞的放疗敏感性。本研究的实验结果显示,过表达 miRNA205 的 U251/miR205 细胞经放射治疗 24 h 后,DNA 损伤标志物未能明显回复到放射治疗前的状态,而对照组 U251/NC 细胞在放射治疗 24 小时后,DNA 损伤标志物 rH2A.X 能够恢复到正常水平,提示 miR205 能够抑制 U251 细胞中 DNA 双链断裂的修复能力。平板克隆形成能力也是反映细胞放疗敏感性的一个重要指标,通过对细胞放射治疗发现,6 Gy 的放射治疗后,对照组 U251/NC 能形成(37±6)个克隆而过表达 miRNA205 的实验组 U251/miR205 细胞仅能形成(15±8)个细胞克隆,证实过表达 miRNA205 能够明显抑制 U251 细胞放疗后的克隆形成能力,提示 miRNA205 具有促进 U251 细胞放疗敏感性的作用。

综上所述,miRNA205 能够抑制 U251 细胞的 DNA 损伤修复能力,抑制胶质瘤细胞系 U251 在放疗后的克隆形成能力,最终导致胶质瘤细胞对放疗的敏感性增强。提示 miRNA205 具有作为胶质瘤放疗增敏靶标的价值。

参考文献:

- [1]周梦茹,车振勇,高重阳,等.miRNA-128、miRNA-101 在脑胶质瘤中的表达及意义[J].癌症进展,2020,18(19):2022-2025.
- [2]Xiao M,Li J,Li W,et al.MicroRNAs activate gene transcription epigenetically as an enhancer trigger [J].RNA Biol,2017,14(10):1326-1334.
- [3]Rupaimoole R,Calin GA,Lopez-Berestein G,et al.miRNA Deregulation in Cancer Cells and the Tumor Microenvironment [J].Cancer Discovery,2016,6(3):235-246.
- [4]Jing N,Yin L,Sun J,et al.Expression levels of miR-205 and miR-506 in colon cancer tissues and their relationships with clinicopathological features[J].Oncol Lett,2018,16(4):4331-4336.
- [5]Yin CY,Kong W,Jiang J,et al.miR-7-5p inhibits cell migration and invasion in glioblastoma through targeting SATB1 [J].Oncol Lett,2019,17(2):1819-1825.
- [6]Zhang L,Liu L,Xu X,et al.miR-205/RunX2 axis negatively regulates CD44(+)/CD24(-) breast cancer stem cell activity[J].Am J Cancer Res,2020,10(6):1871-1887.
- [7]Duan B,Guo T,Sun H,et al.miR-205 as a biological marker in non-small cell lung cancer [J].Biomed Pharmacother,2017(91):823-830.
- [8]Qin RF,Zhang J,Huo HR,et al.MiR-205 mediated APC regulation contributes to pancreatic cancer cell proliferation[J].World J Gastroenterol,2019,25(28):3775-3786.
- [9]Li X,Li Y,Han Y,et al.miR-205 Promotes Apoptosis of Cervical Cancer Cells and Enhances Drug Sensitivity of Cisplatin by Inhibiting YAP1 [J].Cancer Biother Radiopharm,2020,35(5):338-344.
- [10]Chen W,Kong KK,Xu XK,et al.Downregulation of miR-205 is associated with glioblastoma cell migration,invasion,and the epithelial-mesenchymal transition,by targeting ZEB1 via the Akt/mTOR signaling pathway [J].International Journal of Oncology,2018,52(2):485-495.
- [11]Zhu D,Tu M,Zeng B,et al.Up-regulation of miR-497 confers resistance to temozolomide in human glioma cells by targeting mTOR/Bcl-2[J].Cancer Medicine,2017,6(2):452-462.
- [12]贺文财.脑胶质瘤患者应用三维适形放疗的效果分析及对生存期的影响 [J].中西医结合心血管病电子杂志,2020,8(1):34,40.
- [13]王竹,杨丽艳,刘圆圆,等.γ-H2AX 和 53BP1 蛋白在肺正常上皮细胞 DNA 氧化损伤反应中的表达 [J].临床检验杂志,2018,36(2):142-147.

收稿日期:2021-02-03;修回日期:2021-02-23

编辑/肖婷婷